

ミヤマタニワタシ(*Vicia bifolia*)における rDNAスペーサー領域の構造的及び進化的解析

矢 倉 公 隆・柳 生 敦 志*

Structural and Evolutional Analyses of rDNA Intergenic Spacer in *Vicia bifolia*

Kimitaka YAKURA and Atsushi YAGYU*

要 旨

ソラマメ属の1種であるミヤマタニワタシ(*Vicia bifolia*)の25S-18S rRNA遺伝子間スペーサー(IGS)領域の全塩基配列を決定した。IGSには3種類のサブリピートが存在し、それぞれBSR I, BSR II及びBSR IIIと名付けた。転写開始点の上流に位置するBSR Iは、長さにも多様性(139~169bp)のある10個のエレメントから構成される直列反復配列であった。一方、BSR II及びBSR IIIは転写開始点の下流に存在していた。BSR IIは、BSR Iの3'末端から456bp下流に位置しており、165bpと163bpの連続する二つのエレメントから構成されていた。BSR IIIは、BSR IIのさらに下流に存在する、58bpエレメントの2回の繰り返しであった。*Vicia*属の4種、*Vicia faba*(ソラマメ; 以下 *V. faba*と記す)、*Vicia bifolia*(以下 *V. bifolia*)、*Vicia angustifolia*(カラスノエンドウ; 以下 *V. angustifolia*)、*Vicia hirsuta*(スズメノエンドウ; 以下 *V. hirsuta*)と*Vicia*属に近い*Pisum sativum*(エンドウマメ)、さらに同じマメ科の*Vigna radiata*(ヤエナリ)の合わせて6種間で、IGSの塩基配列の比較を行った結果、*Vicia*属の4種と*Pisum sativum*合わせて5種間には、進化速度の異なる相同領域がいくつか存在することが明らかとなった。IGS内の一部の塩基配列を指標にして分子系統樹を作成した結果、*Vicia*属の4種の系統的な関係が、従来の形態観察や核型解析等から結論づけられたものと一致し、IGS内の

この領域が分子系統樹を構築する上での有効な指標となりうることが示唆された。

緒 言

タンパク質合成の場であるリボソームは、真核生物では4種のrRNA(25~28S, 17~18S, 5.8S, 5S)と数十種類のタンパク質との複合体として大小二つのサブユニットから構成されている。rRNAのうちRNAポリメラーゼIIIによって転写される5S rRNA以外は、RNAポリメラーゼIにより一続きに転写された前駆体RNAがプロセッシングを受けることによって生ずる。これらのrRNAの遺伝子は、転写の方向に沿って、17~18S, 5.8S, 25~28Sの順に短いスペーサー(ITS; internal transcribed spacer)を介して並んでおり、さらにこの単位が大きなスペーサー(intergenic spacer; IGS)を介して直列に反復していわゆるrDNAを形成している。その反復数は種によって異なり数百から数千回繰り返されている。

一般にrRNAのコード領域は進化的に高度に保存されているが、IGSは進化の速度が速く、種によってその長さあるいは塩基配列が大きく変異することが知られている。しかし、進化の速度が大きいにもかかわらずこのIGSには、転写開始点を含む転写プロモーター、転写終点あるいはその他の転写調節に関わるシスエレメントなどの重要な塩基配列が存在することが、下等真核生物、昆虫、両生類あるいは哺乳類など

で明らかにされている (Reeder 1989, Reeder 1992)。このことは、RNAポリメラーゼIIによる転写プロモーターが生物種間で保存性が高いということと対照的であり、したがって、rDNAのIGSの進化のパターンを探ることは、RNAポリメラーゼIの転写機構の進化を理解する上で必須である。そのためには、IGSの構造を近縁な種間で比較することが重要であり、またこのような比較は、RNAポリメラーゼIの転写機構の進化に加え、近縁な生物種間の系統関係を明らかにするための有効な手段となると考えられる (Appels and Honeycutt 1986)。

rDNAのIGSの構造に関する研究は多くの生物種にわたってなされており、塩基配列レベルのデータもかなり蓄積されつつある。その中には、近縁な種間でIGS構造の比較を行ったもの (Din and Engberg 1979, Tartof 1979, Renkawitz-Pohlら1980, Dvorak and Appels 1982, Rogers and Bendich 1987, Rainaら1995) もあるが、それらはもっぱら制限酵素断片長多型あるいはDNA融解曲線の解析によるものであり塩基配列レベルの比較はほとんどなく、あってもIGSのごく一部の領域に限られた解析 (Bachら1981) にとどまっている。しかし最近、植物において主に同一科内の種間でIGSの全領域にわたった塩基配列レベルの比較をした報告 (Cordesseら1993, Borisjukら1997) がなされた。しかし、さらに近縁な種間、例えば同一属内で詳細に比較している例はほとんどない。

筆者らはマメ科の一属である *Vicia* 属におけるrDNAのIGSの進化の様式を明らかにすることを目的に、すでに *V. faba* (Katoら1990), *V. angustifolia* (Uekiら1992) 及び *V. hirsuta* (Yakura and Nishikawa 1992) の3種についてIGSの全塩基配列を決定し、それらの構造的特徴について報告している。

Chooi (1970) は *Vicia* 属の様々な種の形態学的観察、ゲノムサイズの比較あるいは核型分析によって *Vicia* 属にErvum節、Cracca節、*Vicia* 節、およびFaba節の4つの節 (Section) を設定

した。またこれらの節がErvum節→Cracca節→*Vicia* 節→Faba節の方向に進化したという考えを提唱している。上記の3種をこれらの節に当てはめると、*V. faba* はFaba節、*V. angustifolia* は*Vicia* 節、そして *V. hirsuta* はErvum節に属する。

そこで本研究では、残るCracca節に属する一種である *V. bifolia* についてIGS領域の塩基配列を決定し、すでに塩基配列が明らかにされている他の3種のIGSとの詳細な比較を行い、*Vicia* 属におけるIGSの進化のパターンを解析した。さらにIGS領域の進化的変異と種の分化との相関についても考察を加えた。

材料と方法

1 rDNAのクローニング

IGS領域の塩基配列決定のために、*V. bifolia* rDNAの25S rRNA遺伝子の3'末端付近にあるEcoRI部位から18S rRNA遺伝子内のXbaI部位までの、IGSの全領域を含む4.3kb DNA断片を、EcoRIとXbaIで切断したファージミドpBluescript II-KS⁺にクローニングした。得られたクローンをpVBEXとして以後の実験に用いた。

2 塩基配列の決定

pVBEXをもとに、XbaI部位からEcoRI部位に向かって様々な長さのデレーションミュータントのシリーズを作成した。これらのデレーションミュータントを大腸菌XLI-Blue株に導入した後、ヘルパーファージMV1184を感染させることによって1本鎖DNAを回収した。これらの1本鎖DNAを鋳型として、 α [³²P]-dCTPを用いたデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法により塩基配列決定を行った。ターミネーション反応後生成物を、8 M尿素を含む10%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。電気泳動後、ゲルを乾燥しオートラジオグラフィーにかけた。

3 塩基配列の解析

得られた塩基配列データは主にコンピュータソフト (DNASIS; 日立エンジニアリング) によって解析した。また系統樹は、系統樹作成ソフト, PHYLIP ver.3.57c (Felsenstein 1993) を用いて最尤法によって作成した。

結果と考察

1 *V. bifolia* のIGS領域の構造

V. bifolia rDNAのIGS領域の全塩基配列 (3645bp) が決定された (図1)。この配列中の塩基番号2291~2302にTATATAGGGGという配列が存在していた (二重下線部)。これと類似の配列モチーフは高等植物rDNAの転写開始点領域に共通して見られ、今まで調べられている植物では、このモチーフ中の3番目のAが転写開始点であることが明らかとなっている。したがって *V. bifolia* のrDNA転写開始点はこのAであることが強く示唆される。図2はこのIGS領域を自己比較したドットマトリックスプロットを示したものである。この図より、転写開始点上流に反復数の多い大規模なサブリピートが存在していることが明らかになった。一方、転写開始点の下流にも反復数の少ない2種類のサブリピートが見出された。これら3種類のサブリピートを、それぞれBSR (*bifolia* subrepeat) I, BSR II及びBSR IIIと名付けた。

BSR Iは10個の連続したエレメント (BSR I-1~I-10) からなり、各々の長さはI-1からI-7までは156bp, I-8とI-9は169bp, そして最後のI-10は5'側が31bp欠失した139bpであった。これらのエレメントのコンセンサス配列はBSR I-1と同じであり、これを基準に各エレメントの相同性を計算した。そのアラインメントと計算値は図3に示した。I-1~I-7は95%を越える非常に高い相同性をしめすが、I-8は75.1%に、I-9では70.4%に低下し、さらにI-10では66.2%と低い値を示した。I-8とI-9の相同性の低下は5'側から33bp下流のCCCCから始まる70bpの領域の相同性が低いことに起因

していた。I-10に関しても、アラインメント上の同様な位置の変異が相同性の低さをもたらしていた。しかし、その他の領域はいずれのエレメントにおいても非常に相同性が高かった。これらのことは、サブリピートBSRIを構成するエレメントは2つのグループに分けることができ、それらは共通の祖先配列から別々の進化経路をたどって現在のBSRIを形成したことを暗示している。このように、IGS内の直列反復配列の末端側のエレメントが中央部分のそれより変異が大きいということは他の種においても見られる傾向である (Barkerら1988)。転写開始点上流に存在する反復配列が転写のエンハンサーあるいはターミネーターとして機能することが動物などでは明らかにされている (Coens and Dover 1982, Reeder 1989) が、植物ではその意義は不明である。しかし、BSR Iのエレメントの3'末端付近にCATGCAAAAあるいはそれと酷似した配列が存在するが、このモチーフは進化的によく保存され、現在まで調べられているほとんどの高等植物において転写開始点上流のサブリピート中に見出される。したがって、植物においてもこの転写開始点上流に存在するサブリピートが重要な機能を持つことが示唆される。さらにこのモチーフは、rDNAの転写プロモーターと思われる領域内にも存在していることから、プロモーターの中核として機能している可能性もある (Lakshmikumaran and Negi 1994)。

BSR IIは転写開始点から約200bp下流の塩基番号2503から始まる約165bpの2つのエレメント (BSR II-1, II-2) の繰り返しであった。この2つのエレメントの相同性は81.8%と高い値であった。BSR IIIはBSR IIからさらに下流の塩基番号2921から始まり、III-1は2978までの58bp, III-2は短い間隔を開けた2998から3055までの58bpである。これらの相同性も85.5%と高い値を示した。一般に動物IGSでは転写開始点下流にサブリピートを持つものはほとんどない。植物におけるこれらの存在意義については今の

CCTCCCAAC CCACGTGTAC AGCCTTGCT CCACCAAGAA AAAGGGTATG AGCGGAAAA AACTTGTGCA ATTTTITTTCA AACGACTAA GTGTACAGCA 100
 CCCGACCCC TCCCCCTCT CGTGTACTGC TGTATGTACA AACGCGTCG ACGTATCCA TATAAGCGTG GGCATCATGG GCCAAGTTTC TCGTAACACT 200
 TTCTATTGG TTGCCAAGTA CACAAGGTTT GCTCACGGGT GGATTTTGTG GAGGAGTCGC AACGTTGCGG CTCTGTCAATT TGTCCGTGCA GTGCATAAT 300
 GGGGGCGTAT GCTCCATGTC ATTTGTAGGT TGACTTGGGA ATCAATCAAC GTAATTAATA AAAACATCAA CACCTCTACG TGTGTGAGA GAAGTCCCGC 400
 CAAAATATTA GCTCAAAAT CTACGCATAG GCCGGTGTTC CCGTGCCCCG CCTCTTGATG CGCGCAGGCC AGTGGTTGGT TGCTTCCGTT CATAGAACAC 500
 TTGAACCGTC GAAAAATCGA AATAAATGGG GGGATCGCCC GAATGCCACG AAACITTGCA GATCCCCCTCT ATTTGTTGGT AGATAGCCCC ATGAAAAAAA 600
 TCAGCCCAAA AGGATGAGCG CAGGCCAGTG GTTGTGTGCT TCCGTTTATA GAACACTTGA ACCGTGAAA ATCCGAAATA AATGTGGGA TCGCCCGAAT 700
 GGCACGAAAC TTGCGAGAT CCCTCTATTT GTTGGTAGAT AGCCCCATGA AAAAAATCAG CCAAAAAGGA TGAGCGCAGG CAGTGGTTGT GTTGCTTCGG 800
 TTCTATGAGC ACTTGAACCG TCGAAAAATCC GAAATAATG TGGGATGGC CCGAATGCCA CGAAACTTTG CAGATCCCCT CTATTGTTGT GTAGATAGCC 900
 CCATGAAAAA AATCAGCCCA AAAGGATGCG CGCAGGCTTG TGGTTGGTGT CTCCGTTCA TAGAACCTT GAACCGTCAA AATCCGAAA TAAATGGGG 1000
 GATGCTCGGA ATGCCAGAA ACTTTGCGA TCCCTCTAT TTGTTGGTAG ATAGCCCAT GAAAAAATC AGCCCAAGG GATGAGCGCA GGCAGTGGT 1100
 TGGTTGCTT CGTTCATAGA ACACITGAAC CGTCAAAAT CCGAATAAA TGGGGGATC GCCGGAATTG CACGAACTT TGCAGATCCC CTCTATTGTT 1200
 TGGTAGATAG CCCCATGAAA AAAATCAGCC CAAGAAGATT CGCGCATGAC AGTGGTTGGT TGCTTCCGTT CATAGAACAC TTGAACCGTC GAAAAATCGA 1300
 AATAATGGG GGGATCGCCG GAATTCGACG AAACITTGCA GATCCCCCTCT ATTTGTTGGT AGATAGCCCC ATGAAAAAAT CAGCCGAAA AGGATCGCG 1400
 CATGACAGTG GTTGGTTGCT TCCGTTTATA GAACACTTGA ACCGTGAAA ATCCGAAATA AATCGGGGGA TCGCCGGAAT GCCACGAAAC TTGCGAGATC 1500
 CTCTCTATT GATGTTAGAT AGTCTCTGA AAAAAATCAG CTCAAAAGGA AGCGCGCAGG CCTGCGCTTG CTGCTTCCG CCCCTTGCGA TAAGTCGGT 1600
 TATACCGTT TCGGCAAAA TATCAAAATA AGTCGAGGCA TGATCGAAAT GCCACGAAAC TTGCGAGATC CTCTCTATT GATGTTAGAT AGTCTCTGA 1700
 AAAAAATCAG CTCAAAAGGA AGCGCGCAGA CCTGCGCTTG CTGCTTCCG CCCCTTGCGA TAAGTCGGT TATACCGTT TCGGCAAAA TATCAAAATA 1800
 AGTCGAGGCA TGATCGAAAT GCTACGAAAC TTGCGAGATC CTCTCTATGT ATTATTAGG ATGTCCATGC AAAAAATCAG CCAAAATTC GATTCTTAAG 1900
 GCATGGTGGC CCTTGAGAAA AAATCGGTT ATACCCATT CGGTAATAA TTCAAAATAA ATCGAGGAAT GATCGAAGG CTATGAACT TTGCGAGATC 2000
 TCTCTATGT TTATGAGGGA TCCCATGCA AAAATTCAGC AAAAAATTCG AATCCTAAGG CATGGTTCCG GCTGTTCCG TTCTTGAAAT TCGGGCGCTT 2100
 AGAAATTC TAATTAATTC ATCCGAAGTA AAAAAATTC AATTTTGTG GGGAGGGATG CTTATATTGT GTTAAACAG CATGCAAAA ATCGTGAATA 2200
 AATTCGAAT CTAGTCATT AAAAGGGGA CTTATGTCTA CAGGAAAAA GGGACCACT TGCTGCAAAA GTGAATAGT CAATCAAACT ATATATAGG 2300
 GAGGCACCTT GGTGCTAG ACTGGGACT TGCCAGGCC GACTGGGACT TTGGCAGCAA CGACGGGGA CGCCCATGGG TGTCCAAGC AATTCGAAG 2400
 ACAAATCCAT CAATCCCTT CCACAAAAAT CAACCAATC ATGAATTTTC CATCATCAA TCCAATGTT ATGATCAAAA TTCAAAATTT GGCTGGATT 2500
 TGTGGCCCGT GCTGGCCACA CGGGGTGTTG GTGCTTGGC ACGGACGGT CCGACGACGG AATCGGAGTT GCGATCGAAG TTITGGCGCA AAACCAATA 2600
 AATTTTGGC ATTCCAATCA TCGAATTATT CTTTGGCGCA AGATCAAAAT TTGAGAAAT TTGGGGTG CCTACTCGG CCAAGCGGAA GGTCCGTGCC 2700
 TTGCCAGCG GTCCGGCGGG CGAATCGGA GTTGGCATG AAGTTTCCC GCAAAACCCC ATCAAAATTT GCTTTTCCAA TCATCGAATA AGTCTTTGGT 2800
 CGAAGATCGA AATTTTAAAG AATTTTGGG CGACACGGAC TTGGTCACGG ACCTCGTTCA GCCCGGCTGG ATGGCGAAG TCTAAGGGAA ATTTTGCTTA 2900
 GGGCAAAACA CTACGTGCGC GAAATTGGAC TTGGACTTGG ACATGGACTT AGACGAGGAC GAGGACGAGG ACGAGGACTT GTACTGGGC TTGGCCTAGA 3000
 ACTTGGACTT GGAATTGGAA TTGGACTTGG ACGAGGACGA GACGAGTAG TAGTACGACG ATGCAAGCGT GTGTGTGGT TTCAGCAAT TTGCCCTATT 3100
 GCTTGGTTTG GTTTTTCATG CCTAGTGGG CGGAATCGG GTTGTGGAT GCTTCCATT GCTGCTATG CTTGGCATTG CGGGGATGG GAGCTTCTGC 3200
 AATGTTGGAT CTGCTGAAA TGGGGCGGTG TGAATGGTGT TGCCTTGTG TGTGTTGCT GGCTCCATGC TTTTGCACG AACGGTGGC ACAATTCCT 3300
 TAATCATTTT TCATGCAATC GGTGTGGT TCTTGTCTT GTTGTCTTG CCTATAAAAT GGTAAACAAG TGGCTGTTA GTTTTAAAC CATCCATAC 3400
 CATTGTGGT TGTGTGGT GCTTAGGAAG TGATTCGTAT GTGCCGTTTT AGATGTCAGG TGTGGCTCT CTGCGGTAC CCACGTATCA CTGATTTCTT 3500
 GGAGGCGGTA CTTGAGATGA CCTTGGTTT ATCCCAAAAT GTCCCTTACT AATGTTGCT TTAATATATG CCCCAGGCTT TTGATGTTT TGATCCCTT 3600
 TGGCGGCGCA AAACITGCAC TATGTGCGA GTCAATAATG GATGC 3645

図1 ミヤマタニワタシ (*Vicia bifolia*) のrDNAスペーサー領域(3645bp)の全塩基配列。
 二重下線部は、植物rDNAの転写開始点領域でよく保存されている配列であり、この
 配列内の矢印のAは予想される転写開始点を示す。その他の矢印付きの下線部は、そ
 れぞれ、サブリピートBSR I, BSR II及びBSR IIIを示している。

ところ不明であるが、ある種の植物で、転写開始点の下流に存在するサブリピートにタンパク質が特異的に結合するとの報告 (Zentgraf and Hemleben 1992) があるので、転写調節のシスエレメントとして機能している可能性が高い。

2 種間でのrDNA IGS領域の比較

図4は、*Vicia*属の4種、*V. faba*, *V. bifolia*, *V. angustifolia*及び*V. hirsuta*, また*Vicia*属に近いと考えられている*Pisum*属の一種である*Pisum sativum*, そして同じマメ科の*Vigna radiata*のrDNA IGS領域をドットマトリックスプロット法により比較したものである。これらのドットマトリックスプロットは、*Vicia*属の中で一番新しい種と思われる*V. faba*との比較において行った。この方法で見ると、*V. faba*に対してIGS領域全般にわたり相同性が高いのは*V. bifolia*であった。25S rRNA遺伝子に近い上流部に相同性の高いことを示す明瞭な直線が見られた。また、転写開始点上流に存在する大規模なサブリピートに関しても比較的相同性の高い部分があり、さらに転写開始点のやや上流部分から18S rRNA遺伝子の5'末端に至る領域も高い相同性が認められた (図4 A)。次に*V. angustifolia*では、転写開始点の上流に存在するサブリピートの範囲内にやはり配列の類似が認められ、この領域に見られる直線は*V. bifolia*の場合よりも明瞭であり、より相同性が高いと思われる。25S rRNA遺伝子の近傍に関しては、*V. bifolia*で見られたような明瞭な相同性は認められなかった。しかし転写開始点のやや下流から18S rRNA遺伝子の5'末端までは*V. bifolia*と同じように明確な配列の相同性が確認された。また、18S rRNA遺伝子のすぐ上流には、*V. faba*では4回反復のサブリピートとして存在する配列と相同性を持つ配列が、*V. angustifolia*においても2回繰り返しのサブリピートとして存在していることが明らかとなった (図4 B)。*V. hirsuta*では*V. bifolia*ほど明瞭ではないが、25S rRNA遺伝子近傍に相同性があり、

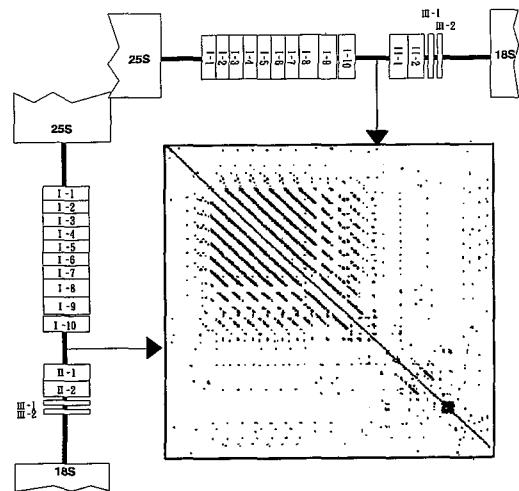


図2 *V. bifolia* rDNAのIGSの自己ドットマトリックスプロット。縦および横軸には、*V. bifolia* IGSの模式図を示した。矢印は転写開始点を表す。

転写開始点上流の大規模なサブリピートの範囲では上記の2種と同様に相同性が見られた。さらに上記の2種と同様に、転写開始点のやや下流から18S rRNA遺伝子の5'末端までの領域が明瞭な相同性が認められた (図4 C)。最後に、同じマメ科でも属の異なる種との比較を行った。*Pisum sativum*は、*Vicia*属の3種よりも全般的に相同性が低い傾向にある。しかし、転写開始点の付近は短い領域ながら相同性があり、さらに、転写開始点のやや下流から18S rRNA遺伝子の5'末端までは異なる属にもかかわらず明瞭な相同性が見られた (図4 D)。しかし、*Vigna radiata*にはIGSの全範囲に渡って有意な相同性はほとんど認められなかった。

異種間のドットマトリックスプロットで表現される直線が種間の類縁関係と正の相関があるとの前提に立つならば、明瞭な直線部分が多ければ多いほどそれらの種がより近縁であることを意味する。図4において*V. faba* IGSをキー配列として*Vicia*属の種間でIGSの相同性を検索

図3 *Vicia bifolia* rDNA IGSに存在するサブリピートのエレメント間の相同性。BSR I (A), BSR II (B)およびBSR III (C)の反復エレメントを並列し、コンセンサス配列に対するそれぞれの相同性を示した。ただし、BSR IIとBSR IIIに関しては、2つのエレメントを直接比較した。コロンは塩基の一致を、ハイフンは塩基の欠失を表す。また、塩基配列の横に示した数字は、図1の塩基配列番号に対応する。

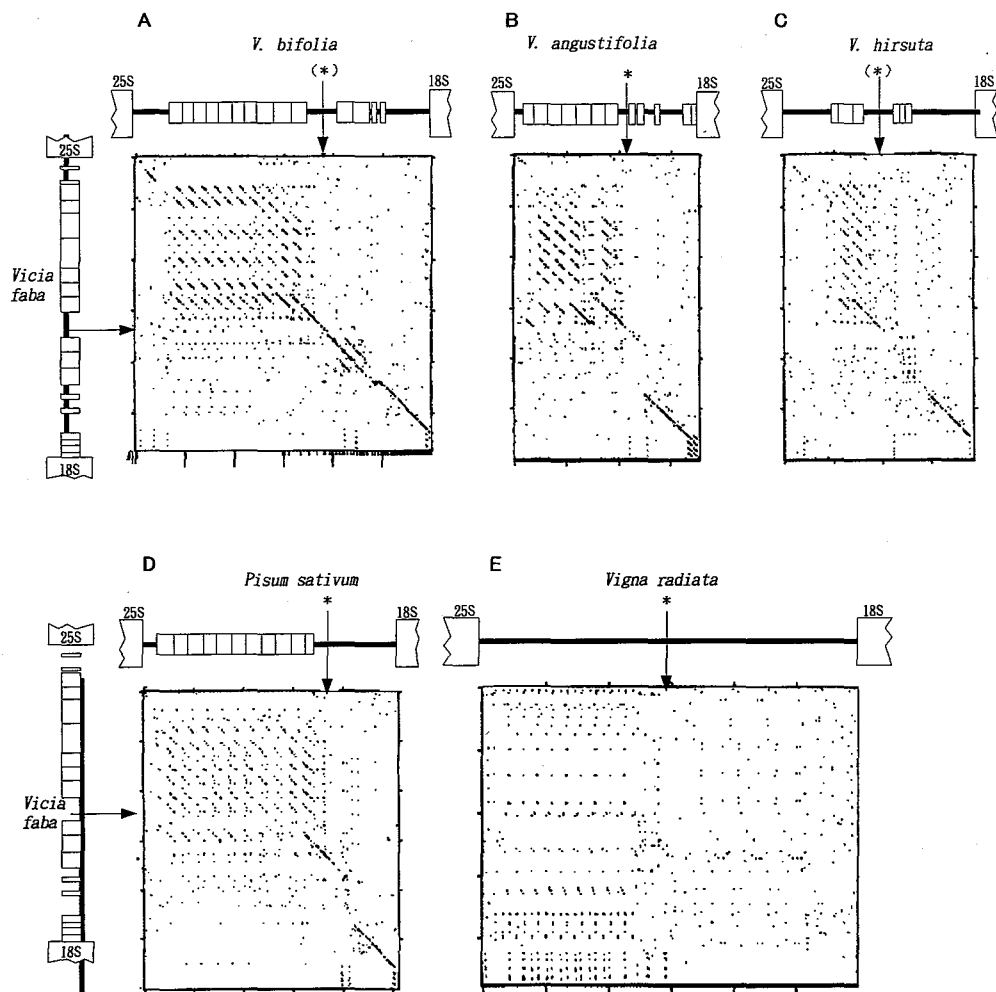


図4 ドットプロットマトリクスによるマメ科植物rDNA IGSの相同性の比較。相同性の検索は、すべてソラマメ (*Vicia faba*) のIGSとの比較で行った。矢印は転写開始点を示す。塩基配列のデータは、*Vicia faba*と*Pisum sativum*はKatoら(1990)、*Vicia bifolia*は本研究、*Vicia angustifolia*はUekiら(1992)、*Vicia hirsuta*はYakura and Nishikawa(1992)、そして*Vigna radiata*はHemlebenら(DDBJ accession X17211)からそれぞれ引用した。

すると、最も直線部分が多いのは *V. angustifolia* と *V. bifolia* であり、*V. faba* と近縁なものはこの2種と考えられる。それに続き *V. hirsuta*、さらに *Pisum sativum* であり、*Vigna radiata* では類縁関係の遠さを反映して直線部分がほとんど検出されなかった。しかし、ドッ

トマトリックスプロットは塩基配列の相同性を詳細に解析したものではなく、大まかな類似性を視覚化したに過ぎない。したがって、類縁関係を明らかにするにはさらに塩基配列の詳細な比較が必要である。

そこで、塩基配列を直接比較した結果を総合

して、*Vigna radiata*を除く5種のIGS領域を比較し、それらの構造を模式的に表したのが図5である。この図では、相同な領域を同じ模様のボックスで示してある。25SrRNA遺伝子に隣接した下流の領域(斜め縦縞)は*Vicia*属4種の間で配列の相同性が見られるが、このすぐ下流の領域(波形横縞)は*Vicia*属4種のうち、*V. angustifolia*には存在しなかった。このことは図4Bのドットマトリックスのパターンに対応している。転写開始点の上流には全ての種でサブリピートが存在し、それらの一部は*Vicia*属の4種間で相同性が見られた(図5の横縞部分)。しかし、このサブリピートには、*V. faba*と*V. bifolia*の2種のみ見られる配列(縦縞部分)も存在していた。さらに下って転写開始点のすぐ上流の約200bp(市松模様)は、*Vicia*属4種とさらに、異なる属の*Pisum sativum*においても保存されていた。さらにこの配列は、唯一*V. angustifolia*ではサブリピートを形成していた。このこのような、*Vicia*属の4種全てと*Pisum sativum*に共通して見られる配列は、18SrRNA遺伝子のやや上流の、約400bpの領域(黒塗り部分)にも存在し、比較的相同性が高いことから、ドットプロットマトリックスでは*Vigna radiata*を除く全ての種においてかなり明瞭な直線が見出された(図4)。転写開始点のやや下流の格子模様ボックス部分は、上流の縦縞領域と同じように、*V. faba*と*V. bifolia*の2種と*Pisum sativum*のみに存在する配列であった。最後に18SrRNA遺伝子の5'末端に接する斜めブロック模様のボックスで示した部分も*Vicia*属と*Pisum*属に共通に見られる進化的に保存性が高い領域であるが、*V. faba*と*V. angustifolia*ではサブリピートとして、その他の種では非反復配列として存在していた。

rDNAの転写開始点付近の十数塩基対は、高等植物においてよく保存されていることが分かっている。図6は、転写開始点の周辺領域を現在まで調べられているマメ科の6種について比較したものである。*Vicia*属の4種と*Pisum*

*sativum*は、いずれも中央部の11bpが、TATATAGGGGGであり全く一致する。さらにその周辺部分を含んだ20bpの領域で、*V. faba*を基準に配列の相同性を計算すると、*V. bifolia*が最も類似しており100%である。次に近いのは、意外にも*Pisum sativum*であり、塩基は2つしか置換しておらず、相同性は90%であった。*V. angustifolia*と*V. hirsuta*はともに5つの塩基が置換しており75%であった。*Vigna radiata*は8つの塩基が置換しており*Vicia*属との遠縁な関係を反映していた。

以上の結果、*Vicia*属のIGSは、種特異的な配列、いくつかの種のみに存在する配列、また他属と共通に持つ配列から構成されていることが明らかとなった。このことは、IGSの進化速度が部分によって異なることを示唆している。

3 IGS領域の配列を指標とした分子系統樹

核酸やタンパク質分子を指標として、互いに近縁な種間の系統関係を明らかにするには進化速度の速いものを利用する必要がある。その点で変異速度の速いrDNAのIGSはその有力な候補の一つと思われる。しかし、分子系統樹を作成する場合、IGSはサイズが非常に大きいことに加え、種によって長さがかなり異なること、さらにIGSが進化速度が異なる複数の部分から構成されていることから、IGSの全領域を指標とすることは不可能である。したがって、IGSを細分化して指標となりうる配列を検索しなければならぬが、その際の必要条件としては、比較する全ての種において保存されている配列であることは勿論のこと、それらが相同な位置にあり且つある程度の長さもつことをあげられる。これらのことを考慮に入れて図5に示したIGS構造を検索すると、18SrRNA遺伝子の少し上流にある非反復配列(黒塗りボックス)がその条件に合う。そこでこの部分の塩基配列のアラインメント(図7)を求め、それをもとに最尤法によって系統樹を作成した(図8)。この系統樹より、*Vicia*属の4種について注目すると、

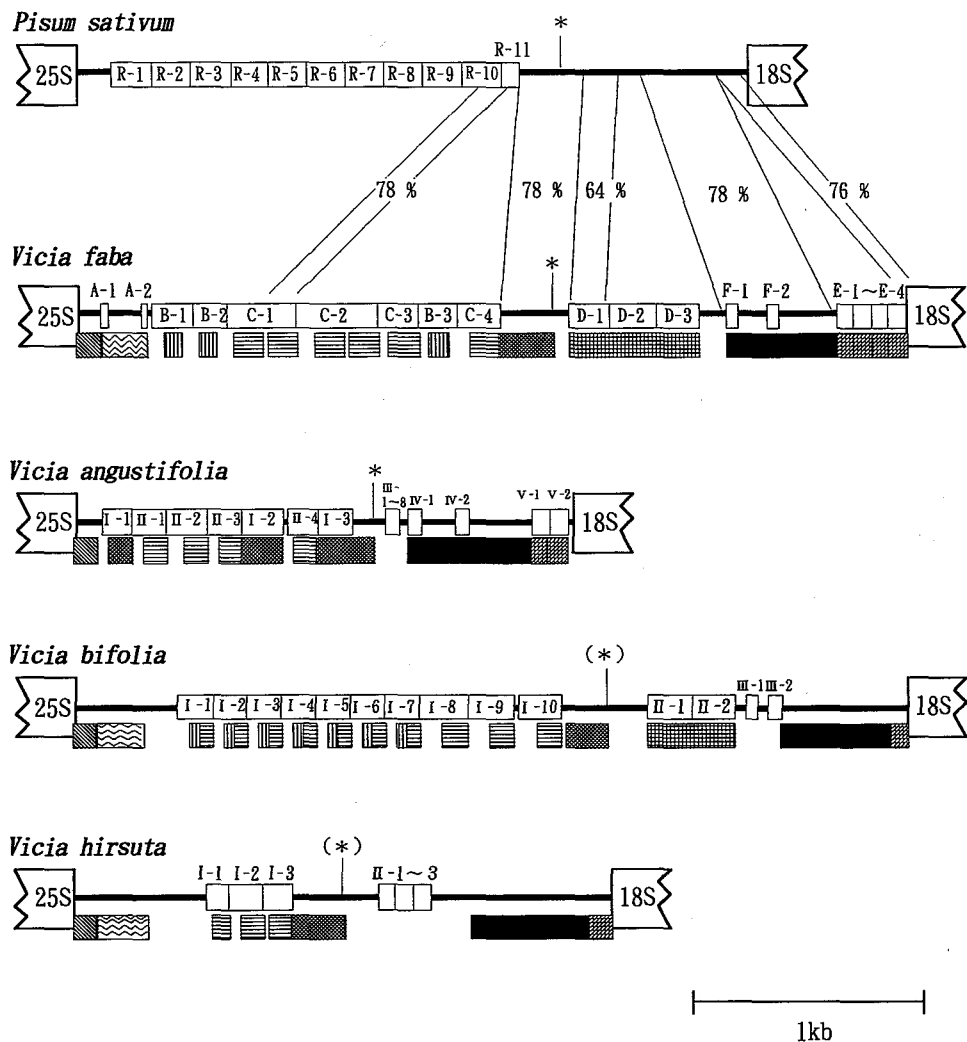


図5 *Vicia*属および*Pisum*属植物rDNAのIGS領域の模式図。IGS中の太い実線は非反復領域を示す。各反復配列のエレメントはボックスで表している。IGSの下の模様付きのボックスは種内あるいは種間で塩基配列が60%以上相同な部分を示している。*は、SIヌクレアーゼ・マッピング法又はプライマー伸長法によって決定された転写開始点を表し、(*)は塩基配列より推定される転写開始点を示す。*Pisum sativum*に関しては、*Vicia faba*と相同性のある領域を直接対応させてそれらの相同率を示した。

V. hirsuta (Ervum節) が最も古く、続いて *V. bifolia* (Cracca 節), そして *V. angustifolia* (Vicia節) 及び *V. faba* (Faba節) とが最も新しく分化したことを示す結果が得られた。これは, Chooi (1971) が, 形態学的観察, ゲノムサイズの比較あるいは核型分析によって, Ervum節→Cracca節→Vicia節→Faba節の方向に進化したという考えを支持するものであり, IGSのこの領域が *Vicia* 属の系統樹を求めるための指標分子として有効と思われる。しかし, *Pisum sativum* が異なる *Vicia* 属のクレード (分岐群) 内に位置するという, 従来の分類体系と明らかに矛盾する結果が得られた。これは, 塩基配列レベルでの収斂進化の可能性も否定できないが, 対象とした種の数が少ないためのエラーであると考えられる。したがって, 今後はさらに解析する種を増やし, また他の系統樹作成法を利用することによって, この領域が系統樹作成の指標として適当かを総合的に評価する必要がある。

参考文献

- Appels, R. and Honeycutt, R. L. : rDNA : evolution over a billion yeas. In DNA systematic (ed. Dutta, S. K.), 2, 82-135, 1986, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Bach, R., Allet, B., and Crippa, M. : Sequence organization of the spacer in the ribosomal genes of *Xenopus clivii* and *Xenopus borealis*. *Nucl. Acids Res.*, 9, 5311, 1981
- Barker, R. F., Harberd, N. P., Jarvis, M. G. and Flavell, R. B. : Structure and evolution of the intergenic region in a ribosomal DNA repeat unit of wheat. *J. Mol. Biol.*, 201, 1-17, 1988
- Borisjuk, N. V., Davidjuk, Y. M., Kostishin, S. S., Miroshnichenko, G. P., Velasco, R., Hemleben, V. and Volkov, R. A. : Structural analysis of rDNA in the genus *Nicotiana*. *Plant Mol. Biol.*, 35, 655-660, 1997
- Chooi, W. Y. : Variation in nuclear rDNA content between species in the genus *Vicia*. Ph. D. thesis, University of Adelaide, 1970
- Cordesse, F., Cooke, R., Tremousaygue, D., Grel-

	-10	+1	+10	homology
<i>Vicia faba</i>	AAACATATAT	AGGGGGAGGC		
<i>Vicia bifolia</i>	AAACATATAT	AGGGGGAGGC		100%(20/20)
<i>Vicia angustifolia</i>	AGCCATATAT	TGGGGGGAC		75%(15/20)
<i>Vicia hirsuta</i>	TCATATATAT	AGGGGGGGG		75%(15/20)
<i>Pisum sativum</i>	AAGCTTATAT	AGGGGGAGGC		90%(18/20)
<i>Vigna radiata</i>	ATCCCTTAT	AGGGGGGAG		60%(12/20)

図6 マメ科植物rDNA転写開始点周辺の塩基配列の比較。塩基の相同性は, ソラマメ (*Vicia faba*) に対するものを%で示している。異なる塩基は影を付した。+1は転写開始点の塩基の位地を表す。塩基配列のデータは, *Vicia faba* と *Pisum sativum* は Katoら (1990), *Vicia bifolia* は本研究, *Vicia angustifolia* は Uekiら (1992), *Vicia hirsuta* は Yakura and Nishikawa (1992), そして *Vigna radiata* に関しては Hemlebenら (DDBJ accession X17211) からそれぞれ引用した。

<i>V. faba</i>	2736	TTGC-TCGGGTGGTTTTTCATGCC-TAG-GCGGCAGAAC-CG-C-TTGTTCGATGCTTCCATTGGCTGCATGCC-TTG-CATCGCG
<i>V. bifolia</i>	3099	TTGC-ITGGTTTGGTTTTTCATGCC-TAGTCGCGCGAAC-TGGCGTGTGGATGCTTCCATTGGCTGCATGCC-TTGGCATTGGC
<i>V. angustifolia</i>	1933	TTGT-TCGTATGAATTTTCATGCC-TAGCGCGCAGAAAT-CGGCGTGGTTGATGCTTCCATTGGCTGCATGCC-TTGGCATTGG
<i>V. hirsuta</i>	2193	TTGC-TTGGTGAATTTTCATGCCAT-GCG-AAC-GAAT-CGGCGTGTGGATGCTTCCATTGGCTGCATGCC-TTGGCATTGGC
<i>Pisum sativum</i>	2438	TTGCCTTGTGTG-TTCTTCATGCC-TAGCGCGGAGAAC-CGGCGTGTGTATGCTACCAATTGGCTGCATGCC-TTGGCATTGG
<i>Vigna radiata</i>	4387	TCTA-TTGAATTTCCGTTTCATGCC-TAGCGATGCTTGGCATTGGCTCACTTGATGTTT-CA-TTGCCTGC-TGCCAGTGGCAAGTGG
<i>V. faba</i>		GGGATGCTGACTTACGCAATCTTGA-TCTTGCTGACG-CGG-GCG-TGTGA-TGG-CATTGCGGATGTTTGTGTTG-CTGGCT
<i>V. bifolia</i>		GGAGTGGGACGTTCTCCAATCTTGA-TCTTGCTGAAA-TGGGGCGGTGAGTGG-T-GTTGGGTTGTTTGTGTTG-CTGGCT
<i>V. angustifolia</i>		GGAGTGGTACGTACACAATCTTGA-TCTAGCTGACGTTTTCGGTGTGAGTGGATACCTTGTGATTTTTGTGTTG-TTGGCT
<i>V. hirsuta</i>		GGGGTGGTT-GTTCTGCGATCTTGGT-TCTTGCACTGC-CGGGGCGTATGAGTGG-TTTTTC-GGATGTATGCGTTTGACCGGCT
<i>Pisum sativum</i>		GGGTCTGTTACGT-CTGCGATCTTGA-TCTTGCTGCTG-TGGGGCGTATGAGTGG-T-ATTGCAATGTTTGTGTTG-CTGGCT
<i>Vigna radiata</i>		GGG-TGG-ACCGTCTCGTGGTGGATGTCTGC-GAAGTGGGGTGTGAGTGG-T-GATGAGGGTGTCTGTGTTG-CTGGCT
<i>V. faba</i>		CCATGCTTTTG-ACCGGAACGGTGAACACAATCCCTATCAATTTTCATGCTTTGGCTGGCTAATC-GTGTGGTTCTTGTTC
<i>V. bifolia</i>		CCATGCTTTTG-CACCGAACGGTGGACACAATCTCTAATCATTTTTCATGCC-----ATCGGTGTGGTTCTTGTTC
<i>V. angustifolia</i>		CCATGCTTTTG-CACCGAACGGTGAACACAATCTCTAATTTTCATGCC-TGCTTGGCTAATCGGTGTGGTTCTTGTTC
<i>V. hirsuta</i>		CAGTCTTTTG-CCCTGAACGGTGCAGCTTCACTCTTGCATTTTCATGCGATGCTTGTGCTTTGGTGTGTTGTGTTGTTTC
<i>Pisum sativum</i>		CTATGCTTTTG-CATGGAACGGTGAACACCAATCTAGTCA-TTTTCAT-----GTGTGTCATC-GTGTGTTGTATGTTTC
<i>Vigna radiata</i>		CCATGC-CTTGTCATCGAACGGTGAACATGCA-TCTGTTCG-TTTTGTCCGTTGCTTGGTGTGATGAGCCGTTAGTCCCT
<i>V. faba</i>		CTGTTGTCTTGGCTATAAAACGGTAAACATTGGCTGGTT-AG-TTTTAAAA-CCATCCCATCCCATTCG-ITGGTGTGGTG
<i>V. bifolia</i>		CTGTTGTCTTGGCTATAAAATGGTAAACAGTGGCTGTT-AG-GTTTAAAA-CCATCCCATCCCATTCG-ITGGTGTGGTG
<i>V. angustifolia</i>		CTGTTGTCTTGGCTATAAAACGGTAAACATTGGCTGGTT-AG-TTTTAAAA-CCATCCCATCCCATTCG-ITGGTGTGGTG
<i>V. hirsuta</i>		CTGTTGTCTTACCTATGAACGGTAAACATGGGCCGTA-TGGTTTAT--CCATCCCATCCCATTCG-ITGGTGTGGTG
<i>Pisum sativum</i>		CTGTTGTCTT-GCCTATAAAATGGTAAACAGTGGGCCGTT-AGTTTAA--CCATCCCATCCCATTCG-ITGGTGTGGTG
<i>Vigna radiata</i>		GTGTT-GCCTACTTCTAAA-CGGTATACGTGGGCCGTTTAGAATTGAT-CCATCCAGGCCCTCTCGGTAGGTGTT-GGAG
<i>V. faba</i>		GCTCTGAAGTGA-TACGTATGCGCGTCTTAAGATGTCAGTGTG---GCGTCTCTTG-CGGTACGGCG-GGG-TCATTGATTTCT
<i>V. bifolia</i>		GCTTAGGAAGTGA-TTGGTATGCGCGTTTA-GATGTCAGTGTG---GCGTCTCTTG-CGGTACGGCG-GTA-TCAGTGATT-CT
<i>V. angustifolia</i>		GCTCTGAAGTGA-TACGTGCGCGCGTTT-GATGTCAGTGTG---GCGTCTCTTG-CGGTACGGCG-GGA-ACACTGAGAT-CT
<i>V. hirsuta</i>		GCTTTGAAGTGA-TACGTACGTGCGTTTA-GACGTCCGTTG---GTGCTCTTG-CGGTGGCAT-GTATCACTGATT-CT
<i>Pisum sativum</i>		GCTTTGAAGTGAAGTGGTGTG-CCGTTTA-GATGTATGTC-G---AGTCTCTTG-CGGTATGAT-GTATCACTGATT-CT
<i>Vigna radiata</i>		GATC--CCATCGTCT-CGCA--CCGTTCCAATGGTGGCGTAAGAACCATTCTTGGCTGACGTTGTGG-AC--GG--TTCT
<i>V. faba</i>		T-GGAAGCGGT-ACCTGAAGATGACATTTGGTTATCCCA--TTGCGTCCCTTACTAAT-GGTGCTCTAAAT 3214
<i>V. bifolia</i>		T-GGA-GGCGGT-ACCTGA-GATGACCTTTGTTATCCCAATTC--TCCTTACTAAT-GGTGCTCTAAAT 3567
<i>V. angustifolia</i>		T-GGA-GGCGGT-ACCTGA-GATGACCTTGGTTATCCCA--CGCGTCCCTTACTAAT-GGTGCTCTAAAT 2415
<i>Vicia hirsuta</i>		T-GGA-GTCCGT-GCTTGA-GATGACATGCGGTTATCCCAATTTG--TCCTTGTCTAAC-GGTGCTCTAAAT 2671
<i>Pisum sativum</i>		T-GGA-GGCGGT-ACCTGA-GATGACCTTTGTTATCCCA--TTATGTCCTTACTAAT-GGTGCTCTAAAT 2905
<i>Vigna radiata</i>		TTAGATGCGGTGAAT-A-CACGAAGTGGGTTAGC-GA-CCCGGGGACAAA--AATCGGTTGC-GTACCT 4861

図7 IGSの下流側に存在する相同領域(図5の黒塗りボックス部分)の塩基配列のアライメント。ハイフンは塩基の欠失, コロンは, *Vicia faba*と一致する塩基に付した。

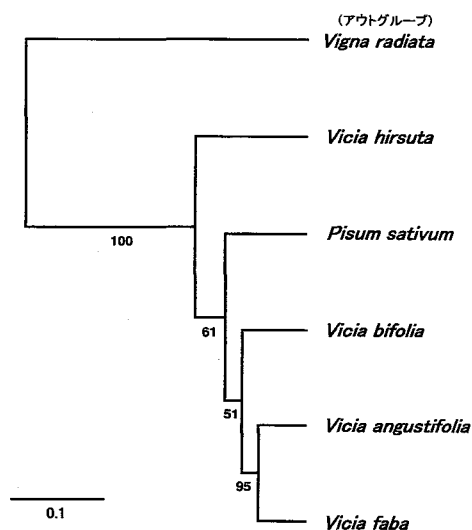


図8 rDNA IGSの一部を指標とした最尤系統樹。図7の整列配列をもとに、500回のブートストラップによってコンセンサス系統樹を求めた。各枝の下に数字はブートストラップの確率(百分率)を、左下のスケールは1部位当たりの塩基の置換数を表す。

- let, F. and Delseny, M.: Fine structure and evolution of the rDNA intergenic spacer in rice and other cereals. *J. Mol. Evol.*, 36, 369-379, 1993
- Din, N. and Engberg, J.: Extrachromosomal rRNA genes in *Tetrahymena*. Structure and evolution. *J. Mol. Biol.*, 134, 555, 1979
- Dvorak, J. and Appels, R.: chromosome and nucleotide sequence differentiation in genomes of polyploid *Triticum* species. *Theor. Appl. Gen.*, 63, 349, 1982
- Felsenstein, J.: PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.57c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle. 1993
- Kato, A., Nakajima, T., Yamashita, J., Yakura, K. and Tanifuji, S.: The Structure of the large spacer region of the rDNA in *V. faba* and *Pisum sativum*. *Plant Mol. Biol.*, 14, 983-993, 1990
- Lakshmikumaran, M. and Negi, M. S.: Structural analysis of two length variants of the rDNA intergenic spacer from *Eruca sativa*. *Plant Mol. Biol.*, 24, 915-927 1994
- Raina, S. N. and Ogihara, Y.: ribosomal DNA repeat unit polymorphism in 49 *Vicia* species. *Theor. Appl. Genet.*, 90, 477-486, 1995
- Reeder, R. H.: Regulatory elements of the generic ribosomal gene. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1, 466-474, 1989
- Reeder, R. H.: Regulation of transcription by RNA polymerase I. In transcription regulation, (ed, McKnight, S. L. and Yamamoto, K. R.; Cold Spring Harbor Laboratory Press) 2, 315-348, 1992
- Renkawitz-Pohl, R., Glaetzer, K. H. and Kunz, W.: Characterization of cloned ribosomal DNA from *Drosophila hydei*. *Nucl. Acids Res.* 8, 4593, 1980
- Rogers, S. O. and Bendich, A. J.: ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol. Biol.* 9, 509-520, 1987
- Tartof, K. D.: Evolution of transcribed and spacer sequences in the ribosomal RNA genes of *Drosophila*. *Cell*, 17, 607, 1979
- Ueki, M., Uchizawa, E. and Yakura, K.: The nucleotide sequence of the rDNA intergenic spacer region in a wild species of the genus *Vicia*, *V. angustifolia*. *Plant Mol. Biol.*, 18, 175-178, 1992
- Yakura, K. and Nishikawa, K.: The nucleotide sequence of the rDNA spacer region between the 25S and 18S rRNA genes in a species of the genus *Vicia*, *V. hirsuta*. *Plant Mol. Biol.* 19, 537-539, 1992
- Zentgraf, U. and Hemleben, V.: Complex formation of nuclear proteins with the RNA polymerase I promoter and repeated elements in the external transcribed spacer of *Cucumis sativus* ribosomal DNA. *Nucl. Acids Res.*, 20, 3685-3691, 1992